Aus dem physiologischen Institut der Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. Ebbecke.

Experimentelle Untersuchungen über photodynamische Erscheinungen und ihren Wirkungsmechanismus.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn.

Vorgelegt am 6. Dezember 1938

von

Fritz Knüchel

aus Bergheim/Erft.

BONN, 1939

Anton Brand.

Gedruckt
mit Genehmigung der mediz. Fakultät
der Univ. Bonn.

Referent: Prof. Dr. Ebbecke
Korreferent: Prof. Dr. Grebe.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Es wurden erstmalig von H. v. Tappeiner und A. Jodlbauer 1.) 2.) Untersuchungen über die Wirkungen von Lichtstrahlen auf Kleinlebewesen angestellt. Sie untersuchten auch als Erste die sonderbare Wirkung, die nach Belichtung eintritt, wenn vorher dem Kulturmedium fluoreszierende Farbstoffe zugesetzt werden. Die durch diese ausgelösten Erscheinungen nannten sie „photodynamische Wirkung" und verstanden darunter eine Sensibilisierung gegenüber Lichtstrahlen. Die Sensibilisierung faßten sie als Folge der Fluoreszenz auf; je stärker also ein Körper in gelöstem Zustand zu fluoreszieren vermag, umso größer müßte seine sensbilisierende Kraft sein.

Später wurden dann von Metzner 3.), Efimoff und Efimoff 4.) festgestellt, daß alle für Licht sensibilisierenden Substanzen die Fähigkeit besäßen, in die lebende Zelle einzudringen: sie vital zu färben. Für sie schien deshalb weniger die Fluoreszenz, als vielmehr das Vitalfärbevermögen der angewandten Farbstoffe ausschlaggebend für die Lichtsensibilisierung zu sein. Ihre Anschauung begründeten sie damit, daß es Farbstoffe gebe, die ohne zu fluoreszieren photodynamisch wirkten: z. B. Methylenblau.

Einen wesentlichen Fortschritt in dieser Erkenntnis schafften Beobachtungen von Ledoux-Lebard 5.), er fand, daß ultraviolettes Licht in jedem Fall in der Lage sei, Paramäcien bei Anwesenheit fluoreszierender Substanzen zu töten, daß dagegen sichtbares Licht eine schädigende Wirkung nur bei Anwesenheit von Sauerstoff entfalte. O. Neuberg 6.) nahm deshalb an, daß es sich bei der photodynamischen Wirkung auf Lebewesen um einen ähnlichen Vorgang handle, wie bei der Sensibilisierung chemischer Reaktionen durch Eisen- oder Uransalze: nämlich um einen durch das Licht ausgelösten Oxydationsvorgang, bei dem die fluoreszierenden Stoffe als Katalysatoren tätig sein sollen. Diese Vorstellung Neubergs nimmt durch Versuche von Noack 7.) an Wahrscheinlichkeit zu, nachdem dieser zeigen konte, daß sich der photokatalytische

Effekt fluoreszierender Farbstoffe durch Zusatz von Natriumhydrosulfit aufheben läßt. Pinkussen 8.) analysiert die Lichtwirkung bei Anwesenheit von Fluoreszenzfarbstoffen etwas genauer: er nimmt an, daß das Licht zunächst auf den Sensibilator (Farbstoff) einwirkt, und daß durch diesen dann sekundär eine Übertragung der so gewonnenen Energie auf die lebende Substanz der Zelle, den Acceptor, erfolgt. — Eine ganz andere Erklärung findet Murakami 9.). Er geht von der Tatsache aus, daß fast alle in Lösung fluoreszierenden Farben in ihrem Molekül Halogenatome, und zwar in leicht abspaltbarer Form enthalten. Die Lichtwirkung stellt er sich nun so vor, daß durch dasselbe die Halogene abgespalten würden und diese dann ihrerseits die an den Lebewesen zu beobachtenden Erscheinungen hervorriefen. Er stützt seine Ansicht durch die Beobachtung, daß die photosensibilisierende Wirkung oft zunimmt mit der Zahl der im Farbstoffmolekül enthaltenen Halogenatome, und daß Zusatz von Jod oder Brom zu Fluoreszein, — das an sich nur eine sehr schwache photodynamische Wirkung hat, — dessen sensibilisierende Eigenschaft stark erhöht. Wieder mehr im Sinne Neubergs versucht Blum 10.) die Wirkung der Farbstoffe so zu erklären, daß sie bei Belichtung als Wasserstoffacceptoren fungieren könnten und dadurch die Bildung von Wasserstoffsuperoxyd ermöglichten.

Aus dieser kurzen Literaturübersicht geht klar hervor, daß eine endgültige und experimentell gesicherte Auffassung über das Wesen der Lichtwirkung bei Anwesenheit photodynamischer Substanzen noch nicht besteht. Eines scheint allerdings sicher: Oxydationsvorgänge spielen eine wichtige Rolle; wobei aber nicht eindeutig geklärt ist, wie sich die sensibilisierende Farbstoffe bei dieser Oxydation verhalten, und ob auch ohne Zusatz der sogenannten sensibilisierenden Farbstoffe schon eine ähnliche Wirkung des Lichtes — vielleicht in abgeschwächtem Maße — vorhanden ist.

Nach Neubergs Auffassung soll eine dauernde Umsetzung des Farbstoffs im Sinne Chinon = Hydrochinon stattfinden, wobei Sauerstoff frei wird. Nach Blum sind die Farbstoffe H-Acceptoren und wirken so als Katalysatoren bei der Bildung von Wasserstoff-

superoxyd; während Murakami wieder eine völlig andere Erklärung abgibt.

Es wurde nun versucht, für die Richtigkeit der einen oder anderen Auffassung experimentelles Beweismaterial zu erbringen. Um die notwendig durchzuführenden Versuche in möglichst großer Zahl und unter möglichst übersichtlichen Beobachtungsbedingungen anstellen zu können, mußte zunächst eine einfache und genau reproduzierbare Beobachtungsvorrichtung geschaffen werden.

Als Versuchstiere sollten auch von mir vorwiegend Paramäcien benutzt werden. Diese wurden nun bisher fast ausschließlich in Röhrchen oder Schälchen belichtet und anschließend auf stattgefundene Veränderungen hin im mikroskopischen Präparat untersucht. Auf diese Weise ließ sich nur ein mehr oder weniger normaler Anfangszustand einem durch die Lichtwirkung verursachten veränderten Endzustand gegenüberstellen. Eine direkte, fortlaufende Beobachtung während der Lichtwirkung war nicht möglich und wurde auch bisher nicht durchgeführt. Es schien mir nun wichtig, den ganzen Verlauf der durch das Licht und die Farbstoffe verursachten Veränderungen zu verfolgen.

Aus diesem Grunde wurde folgende Beobachtungsvorrichtung hergestellt: Als Lichtquelle wurde eine Kohlenbogenlampe von 15 Amp. mit möglichst dünnen Kohlestiften auf den Spiegel eines Mikroskops durch ein geeignetes Linsensystem zentriert bei sorgfältiger Abblendung aller ungeordnet austretenden Srahlen. Unmittelbar vor die Lampe wurden eine große, 10 cm dicke Küvette mit 10%iger Kupfersulfatlösung und eine zweite mit Leitungswasser geschaltet. (Hierdurch werden fast alle ultraroten und ein geringer Teil der roten sichtbaren Strahlen absorbiert.) Das benutzte Mikroskop war für Hell- und Dunkelfeldbeobachtung eingerichtet. Durch Zwischenschaltung eines Schwarzglasfilters UG II von 2 mm Dicke (Fa. Leitz) zwischen Spiegel und Kendensor erreicht man eine weitere, fast völlige Ausschaltung der sichtbaren Lichtstrahlen, sodaß danach nur noch ultraviolettes und geringe Spuren violetten Lichtes bis zum Objekt gelangen können (340—420 μμ). Um eine einwandfreie Beobachtung von Fluoreszenzerscheinungen zu erreichen, müssen aber

alle sichtbaren Strahlen ausgeschaltet werden. Dies läßt sich durch Einlegen einer kleinen, runden Uvetglasscheibe in das Okular in vollkommener Weise erreichen. Verwendung von Quarzküvetten oder Linsen ist zur Beobachtung von Fluoreszenzerscheinungen nicht unbedingt erforderlich, wenn als Lichtquelle Kohlenbogenlicht von nicht allzu kurzer Wellenlänge verwandt wird. Auch die Benutzung von metallimprägnierten Kohlen bietet eher Nach- als Vorteile, 1. da sie ein Licht von sehr wechselnder Helligkeit geben und weil 2. die durch den Metalldampf entstehenden diskontinuierlichen Lichtemissionen zur Erregung von Fluoreszenzerscheinungen offenbar weniger geeignet sind, als ein kontinuierliches Lichtspektrum.

Da sich offene Kulturen und solche in hängenden Tropfen schlecht zur mikroskopischen Beobachtung eignen, kann man die Präparate folgendermaßen anfertigen: Aus einer Pipette wird auf einen Objektträger ein etwa fünfpfennigstückgroßer Vaselinering aufgetragen von der Dicke einer Bleistiftmine, und in die so entstandene kleine Kammer werden einige Tropfen der Kulturflüssigkeit mit Paramäcien eingefüllt. Durch Aufdrücken eines Deckglases wird die Kammer luftleer und allseitig luftdicht abgeschlossen. Die Schichtdicke der eingefüllten Flüssigkeit darf nur wenig höher als die Dicke eines Paramäciums sein, um ein Entweichen der Tiere aus der Bildebene zu verhindern, da sonst eine längere Beobachtung ein und desselben Tieres unmöglich wäre. In dieser Kammer bleiben die Tiere auch unter Luftabschluß drei bis vier Tage ohne sichtbare Veränderung; danach gehen sie unter allmählichem Langsamerwerden ihrer Bewegungen zugrunde.

Es wurde nun zuerst das Verhalten der Paramäcien im Lichtpunkt des Dunkelfeldes unter Verwendung von nur sichtbaren Lichtstrahlen untersucht. — Die ultravioletten Strahlen lassen sich durch Einschalen von Uvetglas v o r den Kondensator vollständig abfiltern. — Die Tierchen zeigen, sobald sie in den Lichtkegel gebracht werden, zunächst eine starke Fluchtreaktion. Unruhig hin und herschwimmend versuchen sie den Lichtstrthlen zu entweichen. Durch Verschieben des Objektträgers gelingt es aber leicht, dies zu verhindern, und man beobachtet dann weiter, wie sie etwa nach 1—2 Minuten plötzlich

den größten Teil ihrer Zilien abwerfen und dabei ihre Bewegung stark ändern. Die normalerweise in Richtung der Längsachse verlaufende, leicht schraubenförmige Bewegung geht in eine viel stärker bohrende bis walzende über. Meist hört dabei die Vorwärtsbewegung ganz auf, sodaß nur noch eine Rotation auf der Stelle übrig bleibt. Daran anschließend zucken die Tierchen einigemale wie durch plötzliche Explosionen erschüttert hin und her, wobei blasenförmige Ausstülpungen der Oberflächenhaut entstehen — vielleicht durch H_2O-Aufnahme — und sich die sonst platte Körperform in eine mehr walzenartige verwandelt. Kurz danach sterben sie. Oft, aber durchaus nicht regelmäßig, nehmen sie hinterher noch weiter an Größe zu bis sie platzen. Die im Inneren der Paramäcien enthaltenen kleinen Granula, die normalerweise schon leicht zitternde Bewegung zeigen, werden viel lebhafter, was auf eine zunehmende Verflüssigung hinweist. Daß tatsächlich eine Quellung und Volumzunahme der Paramäcien stattfindet ist daran ersichtlich, daß die sonst in der Seitenansicht flachen Tiere kurz nach Abwerfen der Zilien allseitig walzenförmig rund erscheinen. Bei dieser Beobachtung fällt schon deutlich auf, daß die anfangs sehr lichtscheuen Paramäcien, je älter die Kultur wird, allmählich das Licht immer weniger stürmisch fliehen und einige Stunden nach Anfertigung des Präparates sich dem Licht gegenüber offenbar völlig gleichgültig verhalten. Dies wurde zunächst als Anpassung oder Gewöhnung gedeutet. Diese „Gewöhnung" tritt aber auch ein bei Tieren, die im Dunkeln gehalten wurden, wo also keine Anpassung an Licht möglich war. Tiere, die vor Anfertigung des Präparates einige Tage im Dunkeln gehalten wurden, reagierten nicht anders als solche, die gewöhnlichem Tageslicht ausgesetzt waren. Durch leichten Druck auf das Deckglas, unter dem sich die inzwischen lichtunempfindlich gewordenen Paramäcien befinden, gelingt es unschwer, eine Spur Kulturflüssigkeit durch die Vaselinedichtung nach außen zu pressen. Stellt man dann in dieser erneut die vorher unempfindlichen Tierchen im Strahlenkegel ein, so verhalten sie sich wieder ganz wie anfangs, d. h. sie haben wieder ihre volle Empfindlichkeit dem Licht gegenüber, die sie jetzt bei offenem Luftzutritt auch nicht wieder verlieren. Setzt man nun einem

frisch angefertigten Präparat einige Körnchen Resorcin, Natriumhydrosulfit oder Ascorbinsäurelösung zu, so verhalten die Tiere sich sofort wie alte Kulturen, d. h. sie fliehen das Licht nicht und erleiden auch nach langer Belichtung keinen erkennbaren Schaden. Aus diesen Versuchen geht klar hervor, daß Licht nur in Anwesenheit von Sauerstoff eine schädigende Wirkung entfalten kann; es ist sogar eine bestimmte Sauerstoffspannung erforderlich, die offenbar höher liegt, als die zum Leben der Tiere nötige. Es ist weiter ersichtlich, daß diese Lichtwirkung auch ohne die Anwesenheit fluoreszierender Substanzen erfolgt. — Eine Wirkung von Wärmestrahlen ist auszuschließen, da fast alle jenseits von Rot liegenden Strahlen völlig abgefiltert werden, was sich auch daran leicht erkennen läßt, daß minutenlange Konzentrierung des Focus auf den Vaselinering des Präparates dort keinerlei Verflüssigung hervorruft. — Dieselben Versuche wurden dann wiederholt mit ultraviolettem Licht, wobei sich die Wirkung mit oben geschildertem U.V.-Mikroskop leicht beobachten läßt. Die Tierchen leuchten hierbei blaßblau auf. Im Inneren liegende kleine chlorophyllhaltige Algen leuchten rot bis hellrosa. Es zeigt sich hierbei sowohl zeitlich als auch in der Art der Reaktion der Paramäcien kein Unterschied gegenüber dem Verhalten für sichtbares Licht. Da es nicht ausgeschlossen erschien, daß diese schon ohne Zusatz von fluoreszierenden Farbstoffen erhaltenen photodynamischen Erscheinungen auf einer Sensibilisierung durch die schon normalerweise in den Paramäcien enthaltenen fluoreszierenden Partikel zu beziehen sind, wurden einige Kulturen in frisches, algenfreies Wasser gebracht. Einige Tage danach enthalten sie keine fluoreszierenden Partikel mehr. Bei ihrer Belichtung läßt sich aber kein Unterschied gegenüber gut genährten Tieren mit viel fluoreszierenden Körpern im Inneren feststellen, wodurch dieser Einwand hinfällig wird. In weiteren Versuchen wurde nun die Veränderung der Lichtwirkung oder Sensibilisierung durch zugesetzte fluoreszierende Farbstoffe untersucht. Als meist geeignete Farbstoffe erwiesen sich Eosin und Fluorescein, die beide stark fluoreszieren und von denen aber nur das Eosin eine deutlich photodynamische Wirkung entfaltet. Setzt man einem nach obiger Art angefertigten Präparat ein kleines

Tröpfchen einer Eosinlösung 1 : 1000 zu und bewahrt es einige Tage lang dunkel auf, so findet man fast alle Paramäcien unversehrt. Eosin hat also in dieser Konzentration an sich keine schädigende Wirkung. Setzt man aber ein solches Präparat kurz nach der Anfertigung sichtbarem oder ultraviolettem oder gemischtem Licht aus, so treten alle oben geschilderten Phasen einer zunehmenden Schädigung der Tiere wieder auf. Jetzt aber so stürmisch, daß die Paramäcien, sobald sie in den Lichtkegel eingedrungen sind, schlagartig ihre Cilien verlieren, einige Male hin und her zucken und sterben. Dieselben Erscheinungen, die schon bei Belichtung ohne Eosinzusatz auftreten, vollziehen sich in überstürzt schneller Weise. Aber auch hier zeigt sich wieder die Abhängigkeit der Schädigung vom Sauerstoffgehalt darin, daß sich auch trotz Eosinzusatz im Verlauf einiger Stunden bis Tage die Lichtwirkung mehr und mehr verliert, um nach Berührung mit der Außenluft schlagartig wieder in voller Stärke nachweisbar zu werden. Es läßt sich durch Zusatz von reduzierenden Substanzen wieder ein voller Lichtschutz erzielen. Da also — wie gezeigt — auch das Licht für sich allein die Schädigung setzt, Zusatz fluoreszierender Stoffe nicht unbedingt erforderlich, die Gegenwart von reichlichem Sauerstoff aber unerläßlich ist, so entfallen einige der vorher mitgeteilten Erklärungsversuche und es entsteht die Vermutung, daß die Lichtschädigung auf einer durch das Licht angeregten Oxydationssteigerung beruhe. Diese Oxydationssteigerung würde dann durch Zusatz fluoreszierender Substanzen allerdings noch erheblich vermehrt, und dadurch quantitativ aber nicht qualitativ von der gewöhnlichen Lichtwirkung verschieden.

Die folgenden Untersuchungen sollen aufzuklären versuchen, worin das Wesen der schädlichen Wirkung des Lichtes und ihrer Steigerung durch Zusatz von fluoreszierenden Substanzen beruht. M u r a k a m i glaubt, es könne dieselbe nur so erklärt werden, daß zu der schon an sich schädlichen Wirkung des Lichtes nur eine weitere Schädigung durch freiwerdende Halogene nach Zusatz fluoreszierender Substanzen hinzukäme. Die Frage nach dem Wesen der Lichtschädigung, wie sie auch o h n e Zusatz fluoreszierender Farbstoffe bereits zu beobachten ist, läßt er unbeantwortet. B l u m nimmt an,

die Lichtwirkung auf Paramäcien sowie ihre Steigerung durch Zusatz fluoreszierender Farbstoffe beruht auf der Entstehung von Peroxyden.

Gegen die Ansicht von Murakamie sprechen folgende Versuchsergebnisse:

Bestrahlt man Eosin mit konzentriertem Kohlenbogenlicht und bringt es hinterher mit Paramäcienkultur zusammen, so müßten auch dann die oben geschilderten Veränderungen eintreten, was aber nach vielen Beobachtungen nie der Fall gewesen ist. Ebensowenig gelingt es, auf folgende Art eine Stütze für die Ansicht Murakamis zu erhalten: es wurden Präparate so angefertigt, daß die Kammer noch durch eine Querwand in zwei Abteilungen, die nur eine enge Kommunikation haben, geteilt wurde. In eine Hälfte wurde Paramäcienkultur, in die andere eine Eosinlösung gefüllt. Dann wurde die Eosin enthaltende Hälfte stark belichtet und hernach bei ganz schwacher Beleuchtung das Verhalten von Paramäcien beobachtet, die von der vorher unbelichteten in die vorher belichtete Abteilung herübergeschwommen waren. An ihnen war nie ein von der Norm abweichendes Verhalten zu beobachten, es waren vielmehr nur diejenigen gestört, die direkt mit dem starken Licht in Berührung kamen, so daß die Möglichkeit einer Abspaltung von Halogenen durch das Licht, auf die die Schädigung zurückzuführen sein könnte, äußerst gering wird. Es ist außerdem auffällig, daß Paramäcien sich auch nach Zusatz relativ großer Brommengen in Form von Bromwasser oder gegen Lugolsche Lösung sehr indifferent verhalten, was weiterhin sehr gegen die Theorie Murakamis spricht.

Es konnte in weiteren Versuchen gezeigt werden, daß auch die Ansicht Blums nicht zu Recht besteht, nach der Peroxyde die schädigende Wirkung haben sollen. Wenn die Entstehung von Peroxyden die schädigende Wirkung haben soll, so müssen Paramäcien im Präparat durch relativ kleine Mengen von Wasserstoffsuperoxyd zu vernichten sein; denn große Mengen können durch Belichtung kaum frei werden. Es wurde deshalb zunächst Kulturen, die bei diffusem, nicht zu hellem Licht gehalten wurden, eine Spur H_2O_2 in Form von Perhydrol zugesetzt. Man sieht dann, wie nach kurzer Zeit die

ganze Kammer mit kleinen Sauerstoffbläschen übersät wird. Bei mikroskopischer Untersuchung finden sich die Paramäcien aber wider Erwarten fast völlig unversehrt zwischen den Bläschen umherschwimmend. Nur ganz wenige sind getötet; wahrscheinlich die, die in direkte Berührung mit dem zugesetzten Perhydrol kamen. Geht man dann aber weiter dazu über, zusätzlich zu belichten, so macht sich die große Menge von Sauerstoff bemerkbar. Die Tierchen sterben jetzt ohne Zusatz von Eosin etwa ebenso schnell, wie im Präparat ohne H_2O_2, nur nach Zusatz von Eosin; gibt man aber außerdem noch eine Spur von Eosin hinzu und belichtet, so genügt jetzt schon eine momentane Einwirkung schwacher Lichtstrahlen, um die Paramäcien wie vom Schlage getroffen zu töten. Hieraus ergibt sich, daß die photodynamische Wirkung des Lichtes, die durch Zugabe fluoreszierender Farbstoffe noch verstärkt wird, nicht auf einer Bildung von Wasserstoffsuperoxyd beruhen kann — wie Blum annimmt —, sondern darauf, daß der schon freie oder sonst in einer leicht abspaltbaren Form vorhandene Sauerstoff in eine wirksamere Form übergeführt, aktiviert wird. Es ist offenbar nicht möglich, daß irgendwie im Molekül fest gebundener Sauerstoff durch die Lichtwirkung — auch nicht bei Anwesenheit fluoreszierender Farbstoffe — herausgelöst und zu anderen Oxydationen verwendet wird. Der Sauerstoff muß vorher, um durch Licht aktiviert werden zu können, in gelöster Form vrhanden gewesen sein. Faßt man so das Wesen der Lichtsensibilisierung als eine Spaltung molekularen Sauerstoffs in aktiven atomaren auf oder besser — wie später noch näher erläutert werden soll — als Aktivierung des Sauerstoffs derart, daß er durch das Licht in eine Form verwandelt wird, in der er als Wasserstoffacceptor fungieren kann, so muß eine Desensibilisierung auf einer Hemmung dieser Aktivierung bzw. auf einem Abfangen oder einer Absättigung des freiwerdenden Sauerstoffs beruhen. Für die Wirkung von Resorcin, Natriumhydrosulfit und Ascorbinsäure sowie aller anderen stark reduzierenden Körper ist dies ohne weiteres verständlich.

In den jetzt folgenden Versuchen soll gezeigt werden, daß auch andere Vorgänge, die als Desensibilisierung der Paramäcien gegenüber Licht aufgefaßt werden können, dadurch zustande kommen, daß

reduzierende Substanzen entstehen, die den durch das Licht aktivierten Sauerstoff abfangen können und so verhindern, daß er seine schädliche Wirkung auf Paramäcien entfaltet. — Efimoff und Efimoff zeigten, daß Zusatz von Eiweiß zu Paramäcienkulturen diese vor Lichteinfall schützt. Viale 11.) wies dasselbe für Aminosäuren nach. Für gewöhnlich glaubt man, daß die Eiweißkörper dadurch schützen, daß sie toxische Farbstoffe oder dergleichen adsorbieren oder daß sie selbst an die Oberfläche von Kleinlebewesen adsorbiert werden und diesen dadurch gegen von außen kommende Einwirkungen Schutz gewähren. Den Aminosäuren wird von Viale eine schon an sich hemmende Wirkung auf den Oxydationsmechanismus zugeschrieben. Teilweisen Aufschluß über diesen Mechanismus erhalten wir durch Versuche von Wels und Jockisch 12.) so wie von Lampert und Wels 13.), die zeigen konnten, daß Eiweißlösungen, die unter Sauerstoffabschluß mit Quarzlicht bestrahlt wurden, zugesetztes Methylenblau entfärbten. Becker und Szendrö 14.) wiesen dann weiter nach, daß durch U.V.-Licht bei Sauerstoffgegenwart Eiweiße im Verlauf langer Zeiten so stark abgebaut werden, daß sie mit den bekannten Fällungsmitteln keine Ausflockungen mehr geben. Aus eigenen Versuchen geht hervor, daß auch gewöhnliches Sonnenlicht, das vorher einige Glasplatten passiert hat — also keine kurzwelligen, ultravioletten Strahlen mehr enthält — Blutserum, das im Verhältnis 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt ist und dem etwas Methylenblau zugesetzt wurde, in einigen Stunden völlig entfärbt. Bei diffusem Tageslicht gelingt die Entfärbung erst in ein bis zwei Tagen; im Dunkeln tritt sie auch in bedeutend längerer Zeit nicht ein. Eine Wirkung von Mikrorganissmen ist somit ausgeschlossen. Bei Belichtung sowohl mit sichtbarem (eig. Versuch) als auch mit ultraviolettem Licht (Wels, Jokisch, Lampert) ist Eiweiß also in der Lage, das Methylenblau zu seiner Leukoform zu reduzieren. — Nach den Untersuchungen von Thunberg wirkt das Methylenblau hierbei als H-Acceptor. Thunbergs Experiment besteht darin, daß man einen geeigneten Farbstoff z. B. Methylenblau, einen „Donator", und einen fermenthaltigen Gewebsextrakt unter Abschluß von Sauerstoff miteinander mischt. Wenn der Ge-

websextrakt einen „Aktivator" enthält wird vom Donator H abgespalten und vom Acceptor übernommen. Die Abgabe von H ist Oxydation, die Aufnahme von H Reduktion, so daß also der Donator oxydiert, der Acceptor reduziert wird. Unter bestimmten Umständen verläuft die Reaktion auch umgekehrt, Im vorher geschilderten Experiment fungieren Eiweiße als „Donatoren" für H und Methylenblau als „Acceptor". Das Eiweiß wird oxydiert, das Methylenblau reduziert wobei — falls kein Aktivator aus einem Gewebsextrakt zugegen ist — der Vorgang erst durch Belichtung zu erkennbarer Geschwindigkeit „aktiviert" wird. Das Licht ersetzt also hier den Aktivator des Gewebsextraktes.

Es genügt zur Entfärbung von Methylenblau nicht, den in der Flüssigkeit absorbierten Sauerstoff zu entfernen, wie sich durch Evakuieren von Methylenblaulösungen oder durch Durchleiten eines indiffenrenten Gases, das allen gelösten Sauerstoff vertreibt, zeigen läßt. Wenn belichtetes Eiweiß in der Lage ist, H abzugeben und dadurch sogar den im Methylenblau gebundenen O_2 diesem zu entziehen, so wird es umso eher fähig sein, den in der Kultur bei Belichtung freiwerdenden Sauerstoff abzufangen und diesen so von den Paramäcien, denen er schaden würde, fernzuhalten. Stimmt diese Vorstellung, so muß sich dadurch, daß die bei Belichtung frei werdende Menge O_2 sehr groß ist, die Eiweißdesensibilisierung ganz oder teilweise aufheben lassen. Es muß also sowohl nach Zusatz von H_2O_2 als auch nach Zusatz fluoreszierender Farbstoffe, ganz besonders aber dann, wenn beide Bedingungen erfüllt sind, die Eiweißdesensibilisierung geringer werden. Es kann hierbei das vorhandene Eiweiß den plötzlich freiwerdenden Sauerstoff nicht restlos binden, bevor sich ein bereits schädlicher Teil mit den Paramäcien verbunden hat. Die Eiweißdesenbilisierung müßte also scheinbar durch Zugabe von Wasserstoffsuperoxyd aufgehoben werden. Würde aber die Eiweißdesensibilisierung auf einer Bindung von durch Belichtung entstehenden toxischen Farbstoffen oder dergleichen beruhen, so dürfte sich durch Zugabe von Wasserstoffsuperoxyd die Desensibilisierung nicht oder nur unwesentlich aufhalten lassen. Dieser Versuch ist ebenfalls geeignet zu zeigen, daß bei der Belichtung von Paramäcienkultur Umlage-

rungen und veränderter Stoffwechsel, der durch das Licht direkt im Inneren der Tiere hervorgerufen wird, weniger eine Rolle spielen, als vielmehr der von außen den Paramäcien in vermehrtem Maße zugeführte aktivierte Sauerstoff. Würde der Angriffspunkt der Lichtstrahlen im Inneren der Tiere liegen, so könnte das außen befindliche Eiweiß keine desensibilisierenden Eigenschaften entfalten.

In hierzu angestellten Versuchen ergab sich folgendes: setzt man zu einer nach obiger Schilderung angelegten Kultur eine Spur Eiklar oder Blutserum zu und belichtet, so verhalten sich die Paramäcien ungestört. Fügt man außerdem Eosin hinzu, so bleibt eine fast völlige Lichtunempfindlichkeit bestehen; die Tierchen werden jetzt nur unruhig. Gibt man dann weiter aber noch Wasserstoffsuperoxyd hinzu, so werden wieder die oben geschilderten Veränderungen an den Tierchen sichtbar Hieraus ergibt sich, daß auch Eiweiß nur durch sein Vermögen Sauerstoff abfangen zu können desensibilisierend wirkt und nicht durch Neutralisation von anderen, toxischen Produkten oder dadurch, daß es an die Oberfläche der Paramäcien adsorbiert diesen allein hierdurch Schutz gewährt.

Bei den Versuchen, die Lichtwirkung durch Zusatz von Eiweiß aufzuheben, fiel weiter folgendes auf: fügt man zu einer stark fluoreszierenden Eosin- oder Fluoresceinlösung geringe Mengen einer Eiweißlösung, so nimmt die Fluoreszenz stark ab. Dies tritt in noch viel größerer Deutlichkeit auf nach Zugabe von Natriumhydrosulfit zu Eosin- oder Fluoresceinlösungen. Der Effekt wurde zunächst so gedeutet, daß einmal durch reduzierende Substanzen und zum anderen durch eine Adsorption des fluoreszierenden Farbstoffs an Kolloide die Fluoreszenzfähigkeit abnähme und darauf dann auch unter Umständen die Lichtschutzwirkung derselben beruhe. Dagegen sprach aber die Tatsache, daß nach Zusatz von Resorcin — einer auch stark reduzierenden Substanz — die Fluoreszenzstärke nicht deutlich verändert wurde und weiter, daß nach Zusatz von Gummi arabicum an Stelle von Eiweiß sich auch kein wesentlicher Einfluß auf die Fluoreszenz bemerkbar machte. Ebenso konnte die durch Eiweißzusatz erreichte Fluoreszenzminderung durch anschließend stattfindende peptische oder tryptische Verdauung nicht wieder rück-

gängig gemacht, sondern noch weiter verstärkt werden. Reduktion und Adsorption scheinen also nicht die hierfür wesentlichen Mechanismen zu sein. Es zeigte sich dann aber weiter, daß die alte Fluoreszenzstärke sich in jedem Fall durch Zusatz von Natriumbikarbonat in genügend großer Menge wiederherstellen läßt; wodurch dieses Phänomen als Folge einer PH-Verschiebung zur sauren Seite hin seine Erklärung findet. Abnahme der Fluoreszenz ist also hierbei als Indikator für eine Reaktionsverschiebung zur sauren Seite hin zu betrachten. Es kann nun im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden, daß bei Präparaten, in denen Eiweiß und Eosin enthalten ist, sofort bei Belichtung eine starke Abnahme der Fluoreszenzintensität einsetzt, was für ein Freisetzen von H-Ionen aus dem Eiweiß durch Belichtung spricht, mit anderen Worten: auf einen Zerfall der Eiweißmoleküle in Aminosäuren hinweist. Daß sich auf die Ansäuerung selbst nicht die desensibilisierende Wirkung beziehen läßt, kann dadurch gezeigt werden, daß ein geringer Säurezusatz zu Kulturen keinen Lichtschutz gewährt, sondern eher sogar leicht sensibilisierend wirkt. Diese Beobachtung war insofern sehr interessant, als sich mit ihr kleine Reaktionsverschiebungen im Inneren von Lebewesen während der Belichtung nachweisen ließen. Es zeigt sich nämlich bei Paramäcien, die intravital Eosin aufgenommen haben — was ihnen ohne Belichtung offenbar wenig schadet — sofort bei Einsetzen der Belichtung und Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop eine starke Abnahme der vorher wahrnehmbaren gelben Fluoreszenz; dies ist jedoch schöner zu erkennen, wenn man statt Eosin das weniger stark sensibilisierende Fluorescin verwendet. Es stehen also sicher durch Belichtung bei Sauerstoffgegenwart im Inneren der Paramäcien Säuren — vielleicht auch durch Eiweißzerfall — die dann nach Erreichen einer bestimmten Konzentration den Tod der Tiere bedingen.

Über die Art der Veränderungen, die durch die Oxydationsvorgänge an Paramäcien und anderen lebenden Zellen hervorgerufen werden, ließen sich noch einige andere Beobachtungen machen. Im Fluoreszenzmikroskop fluoreszieren Paramäcien blaßblau, die Partikel in den Nahrungsvakuolen rot bis rosa. Eosin fluoresziert in der Kulturflüssigkeit grüngelb, Fluorescein gelbgrün. Hält man nun

Paramäcien in einer verdünnten Eosinlösung längere Zeit im Dunkeln, so nehmen einige Tiere den Farbstoff auf und leuchten bei mikroskopischer Betrachtung intensiv gelbgrün. Durch Belichtung nimmt, wie oben geschildert, die Intensität der Fluoreszenz im Inneren der Tiere ab, wobei diese zugrunde gehen. Belichtet man aber Tiere, die noch keinen Farbstoff enthalten, so bemerkt man, wie der Farbstoff schnell in die Zelle eindringt und die blaue Fluoreszenz sich in eine gelbgrüne verwandelt. Ein nachträgliches Abblassen des Farbstoffes ist bei letzterer Versuchsanordnung nicht erkenntlich. Dieses Phänomen deutet auf eine unter der Lichtwirkung zunehmende Permeabilitätssteigerung der Zellgrenzschicht hin. Offenbar steigt unter dem Einfluß des Lichtes auch der osmotische Druck im Inneren der Zelle stark an. Hierauf weist die bei Belichtung auftretende Volumzunahme hin. Etwa in derselben Phase, in der Paramäcien ihre Cilien abwerfen, kann man nämlich eine leichte Verkürzung derselben im Längsdurchmesser und eine geringe Zunahme des Breitendurchmessers wahrnehmen, während die sonst in Seitenansicht flach erscheinenden Tiere allseitig gleich dick und aufgeblasen erscheinen und oft sogar platzen. Diese Erscheinung läßt sich noch besser an Amöben beobachten, die den Farbstoff wesentlich schlechter aufnehmen, unter Lichtwirkung zunehmend größer werden, sich dabei mit dem Farbstoff imprägnieren und zum Schluß dann ebenfalls platzen.

Daß durch Licht eine Membranpermeabilitätssteigerung erfolgt, konnte weiter auf folgende Art gezeigt werden: Legt man Erythrocyten in eine verdünnte Eosin- oder Fluoresceinlösung und hält sie danach im Dunkeln, so nehmen sie den Farbstoff noch nicht auf und sind deshalb im Fluoreszenzmikroskop nur schlecht an ihrer blaßblauen Fluoreszenz zu erkennen. Bewahrt man die so hergestellten Präparate dagegen einige Stunden bei nicht zu intensivem Tageslicht auf, so erscheinen die Erythrocyten bei mikroskopischer Betrachtung in der Fluoreszenzfarbe des zugesetzten Farbstoffes. Eine zusätzliche Belichtung unter dem Mikroskop bedingt dann meist eine schlagartige Hämolyse. Es treten also auch hier wieder beide durch die Lichtwirkungen hervorgerufenen Faktoren klar zutage: einmal die Permeabilitätssteigerung, zum zweiten die Steigerung des osmotischen

Druckes im Inneren der Zelle, die offenbar durch einen Zerfall großer Moleküle in kleinere zustande kommt.

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen:

1. Eine Einwirkung von sichtbaren sowie von langwelligen U.V.-Strahlen findet nur bei Anwesenheit von genügend Sauerstoff statt.
2. Dieser Sauerstoff muß in physikalisch gelöstem Zustand zur Verfügung stehen oder darf nur locker gebunden sein; chemisch gebundener Sauerstoff genügt nicht.
3. Durch Lichtstrahlen wird molekularer, inaktiver Sauerstoff in die aktive, atomare Form übergeführt. Diese Umwandlung erfolgt nicht über die Zwischenstufe von Wasserstoffsuperoxyd, sondern vollzieht sich unmittelbar; der Sauerstoff wird zum H-Acceptor.
4. Durch Anwesenheit bestimmter fluoreszierender Substanzen wird diese Aktivierung gefördert.
5. Der aktivierte Sauerstoff läßt sich durch reduzierende Substanzen abfangen, womit die Wirkung auf die lebende Zelle aufgehoben wird. Eine Desensibilisierung der Zelle selbst, etwa durch „Gewöhnung" findet nicht statt.
6. Bei der Einwirkung des Sauerstoffs auf die Zellen oder auf Eiweiß entstehen saure Zerfallsprodukte, die sich an einer Abnahme der Fluoreszenzintensität erkennen lassen. Gleichzeitig entstehen reduzierende Zerfallsprodukte.
7. Der Lichttod von Kleinlebewesen erfolgt durch Freiwerden saurer Valenzen jn ihrem Innern und durch eine damit verbundene Steigerung des osmotischen Drucks, evtl. gleichzeitig mit einer Permeabilitätssteigerung der Zellgrenzschicht.
8. Die lebende Zelle schützt sich dadurch vor zu starker Lichtschädigung, daß die durch das Licht freiwerdenden Eiweißzerfallsprodukte ihrerseits als reduzierende Substanzen eine weitere Wirkung des Lichts verhindern.
9. Für die praktische Medizin ergibt sich daraus, daß ein Lichtschutz der Haut durch Zufuhr genügender Mengen reduzie-

render Substanzen erreicht werden muß (Verabreichung von Vitamin C) und daß bei Krankheiten bei einem Vitamin-C-Defizit eine intensive Lichtbestrahlung (Höhensonne) nicht angebracht erscheint.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. E b b e c k e höflichst danken für die Anregung zu dieser Arbeit und das jederzeit freundliche Interesse, das er ihrer Ausführung entgegengebracht hat.

Literatur.

1.) H. v. Tappeiner u. A. Jodlbauer: Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Leipzig 1907.
2.) H. v. Tappeiner: Erg. Physiol. (Ascher-Spiro) 8, 1909.
3.) P. Metzner: Biochem. Z. 148, 498, 1924.
4.) A. Efimoff u. W. Efimoff: Biochem. Z. 155, 376, 1925.
5.) Ledoux-Lebhard: Ann. Inst. Pasteur 16, 587, 1902.
6.) C. Neuberg: Veröff. Z. stelle Baln. 1. Heft, 12, 1912.
7.) K. Noack: Z. Bot. 12, 273, 1920.
8.) Ludw. Pinkussen: Photobiologie, Leipzig 1930.
9.) Murakami: Jap. J. med. Sci. Trans. III, Biophys. 2, 149, 1932.
10.) Blum, Harald F.: Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 30, 718, 1933.
11.) Viale, G.: Verh. 1. intern. Kongr. Elektro-Radio-Biol., 1, 505, 1935.
12.) Girovec, Otto und Zdeněk Ziegler, Z. f. exp. Med. 90, 651, 1933.
13.) Wels, P. und Margot Jokisch: Naunyn-Schmiedeberg Arch. 171, 480, 1933.
14.) Lampert N. und P. Wels: Naunyn-Schmiedeberg Arch. 175, 554, 1934.
15.) Becker J. P. und Szendrö: Pfl. Arch. 228, 755, 1931.

LEBENSLAUF.

Am 10. 2. 1911 wurde ich als Sohn des Gärtnereibesitzers Friedrich Knüchel und seiner Frau, Margarete geb. Koch, in Bergheim-Erft geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Bergheim absolvierte ich das dortige Realgymnasium bis zur Obersekundareife. Anschließend besuchte ich das städt. Realgymnasium in Bedburg, wo ich Ostern 1929 das Reifezeugnis erhielt. Ich widmete mich dem Medizinstudium in Bonn, bestand dort nach dem 5. Semester das Physikum und nach dem 11. Semester das medizinische Staatsexamen. Von meinem Medizinalpraktikantenjahr arbeitete ich sechs Monate am Physiologischen Institut der Universität Bonn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Ebbecke, vier Monate an der Medizinischen Universitätsklinik bei Herrn Prof. Dr. Martini und den Rest des Jahres am Landesbad Aachen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Slauck. Im Januar 1937 erhielt ich meine Bestallung als Arzt und bin seit der Zeit als Volontärassistenzarzt am Landesbad Aachen tätig.